Aus dem Röntgeninstitut der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. A. Liechti
und dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern
Direktor: Prof. Dr. A. von Muralt

Arbeit unter der Leitung von P.-D. Dr. W. Wilbrandt

HAEMOLYSE DURCH ULTRASCHALL

(erschienen 1942 in „Strahlentherapie", 72. Band)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

Alexander Cerny
aus Wien (Oesterreich)

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. Ad. Liechti von der Medizinischen Fakultät der Universität Bern zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 28. Oktober 1942.

Der Dekan der Medizinischen Fakultät:

PROF. DR. A. VON MURALT.

Sonderabdruck aus „**Strahlentherapie**“ 72. Band (1942)
Mitteilungen aus dem Gebiete der Behandlung mit Röntgenstrahlen und radioaktiven Substanzen, Licht und Kurzwellen
Zeitschrift der Deutschen Röntgengesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Lichtforschung
Verlag von Urban & Schwarzenberg in Berlin und Wien

Aus dem Hallerianum und dem Röntgeninstitut der Universität zu Bern

Untersuchungen über Strahlenhämolyse

4. Mitteilung: Hämolyse durch Ultraschall

Von

A. Cerny, A. Liechti und **W. Wilbrandt**

Mit 7 Bildern

In den früheren Mitteilungen dieser Untersuchungsreihe [Liechti und Wilbrandt 1941 (1), Liechti und Wilbrandt 1942 (2), Bühlmann, Leu, Liechti und Wilbrandt (3)] wurde gezeigt, daß die Hämolyse durch Röntgenbestrahlung und Ultraviolettbestrahlung eine kolloid-osmotische Hämolyse ist, d. h. daß die Erythrozytenmembran unter dem Einfluß der Bestrahlung für Kationen permeabel wird und daß dann Salz und Wasser in die Zellen eindringt und osmotische Schwellung bis zur Hämolyse auslöst. Auch eine Reihe von anderen Hämolysearten, wie die Wärmehämolyse, Alkohol-, Äther- und Chloroformhämolyse, Saponinhämolyse und andere kommen auf diese Weise zustande, wie in einer anderen Mitteilung [Wilbrandt 1941 (4)] gezeigt wurde. Dagegen gibt es auch Hämolysearten, bei denen die Zellen sich auflösen, ohne vorher osmotisch zu schwellen, und die daher als „nichtosmotische Hämolysen" bezeichnet wurden, z. B. die Ambozeptor-Komplementhämolyse u. a.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, die durch Ultraschall auslösbare Hämolyse unter dem gleichen Gesichtspunkt zu analysieren. Wird die Membran durch den Ultraschall für Kationen permeabel oder wird sie mechanisch unmittelbar zerstört?

Die Beobachtung sehr starker zerstörender biologischer Wirkungen geht auf Langevin (5) zurück. Die ersten Ultraschallversuche mit Blut wurden von Dognon und Biancani (6) vorgenommen, die einen starken hämolysierenden Effekt bei kleinen Konzentrationen feststellen konnten. Größere Blutkörperchenkonzentrationen wurden von den ihnen zur Verfügung stehenden Schallwellen nicht beeinflußt. Diese Autoren machten auch die Beobachtung, daß bei engen Gefäßen (Röhrchen von etwa 2 mm Durchmesser) sich die Erythrozyten durch Ansammlung in den

Bäuchen stehender Wellen der Zerstörung entziehen konnten. Wurden sie mit Gewalt durch Strömung des beschallten Mediums aus den geschützten Stellen diffus verteilt, so fand eine Hämolyse wieder statt. Dognon und Biancani, ebenso wie Getzel (7) glauben, daß der Wirbelbildung eine wesentliche Bedeutung für die Auslösung der Hämolyse zukomme. Nach M. Reggioni (8) soll das Vogelblut (Hahn) resistenter sein als dasjenige vom Hammel und vom Frosch. Gelatinezusatz zu Blutkörperchensuspensionen verringert die Hämolyse. Die Wirkung der Schallwellen ist offenbar auf das starke Wechseldruckgefälle zurückzuführen, das bis 10 kg pro Quadratzentimeter und pro Millimeter ausmachen kann (Dognon und Biancani). Da Fette und Lipoide sich unter Beschallung rascher erwärmen als etwa Wasser oder gar Gelatine, wäre auch an eine selektive Erwärmung der Lipoidhüllen zu denken. Die Wirkung der Schallwellen kann auch durch Entgasung bzw. durch gleichmäßigen Druck von 0,5 bis 1 Atmosphären herabgesetzt werden. Diese Beobachtungen sprechen für die Annahme, daß für die biologische Wirkung des Ultraschalls die Gasblasenbildung, die man sich durch den hohen Wechseldruck entstanden denkt (Kavitation), eine wesentliche Rolle spielt. [Man vergleiche im übrigen Hiedemann: „Der Ultraschall" (9), wo auch ein ausführliches Schrifttumsverzeichnis zu finden ist.]

Methodik

Als Schallgeber wurde ein Ultraquarz von Steeg & Reuter mit einer Eigenfrequenz von etwa 500 kHz und einem Durchmesser von 60 mm verwendet. Er stellt eine Kapazität von 32 pF dar. Die Fassung war ebenfalls von der gleichen Firma; der Quarz grenzt unten gegen Luft, die ganze Anordnung wird in Öl betrieben. Der Quarz wurde angeschlossen an einen Sender, der uns in freundlicher Weise von Herrn Direktor Buchmüller vom Eidg. Amt für Maß und Gewicht entworfen wurde. Taylor-Röhre T 200 mit einer Anodenverlustleistung von 200 Watt; 2,5 kV Anodenspannung, bis 350 mA Anodenstrom. Die Abstimmung der Sekundärseite des Hochfrequenztransformators erfolgt durch einen variablen Luftkondensator. Die Kontrolle der Leistung am Quarz erwies sich nach den Untersuchungen von Herrn Direktor Buchmüller des Eidg. Amtes für Maß und Gewicht als durch die Stromstärke im Quarzkreis genügend definiert. Sie wurde mit einem Hitzdrahtinstrument gemessen. Die Beziehungen der Stromstärke zu der Leistung am Quarz gibt die folgende Tabelle:

Leistung, Watt	30	40	60	80	100	120	145	185	225	250
Strom, mA ..	200	250	300	350	400	450	500	550	600	620

Das Blut wurde in 10proz. Suspensionen in Erlenmeyer-Kolben oder Reagenzgläsern in das Ölbad eingesenkt und durch die Glaswand hindurch beschallt. Es wurde defibriniertes Hammelblut benützt, das von der Entnahme ab stets im Kühlschrank aufbewahrt wurde (bis zu 4 Tagen). Die Unterscheidung zwischen osmotischer und nicht-osmotischer Hämolyse geschah, wie in der ersten Mitteilung ausführlicher dargestellt wurde, durch photoelektrische Verfolgung der osmotischen Resistenz. Zu diesem Zweck wurden aus der beschallten Suspension während der Beschallung Proben entnommen, in hypotonischen oder isotonischen Kochsalzlösungen suspendiert und photometriert. Die Einzelheiten des Vorgehens sind in früheren Mitteilungen dargestellt worden.

Der nicht-osmotische Charakter der Hämolyse

In Bild 1 sind osmotische Resistenzkurven von Blut wiedergegeben, die während der Beschallung zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen wurden. Die Kurven zeigen eindeutig den Charakter der nicht-osmotischen Hämolyse. In den Salzkonzentrationen, in denen vor der Beschallung keine Hämolyse auftritt, steigt die Lichtdurchlässigkeit gleichmäßig an, so daß dieser Kurventeil sich etwa parallel nach oben verschiebt, bis auch in den höheren Salzkonzentrationen alle Zellen hämolysiert sind und die Lichtdurchlässigkeit daher in allen Konzentrationen gleich wird. Die hämolytische Grenzkonzentration, bei der die osmotische Hämolyse beginnt, verschiebt sich dagegen gar nicht, d. h. es tritt keine osmotische Schwellung ein.

Es wurde weiter geprüft, ob vielleicht nach Verabfolgung einer Schalldosis, die nur zu einer geringgradigen Hämolyse führt, eine Änderung der Ionenpermeabilität doch nachzuweisen ist. Bild 2 zeigt einen solchen Versuch. Die Kurve der osmotischen Resistenz hat sich hier durch die Beschallung in den höheren Salzkonzentrationen um einen geringen Betrag (etwa $^1/_{10}$ des gesamten Bereichs bis zur vollständigen Hämolyse) gehoben. Nach der Beschallung wurden die beschallte sowohl als die unbeschallte Suspension im Kühlschrank aufbewahrt und im Verlauf der folgenden drei Tage mehrmals auf ihre osmotische Resistenz geprüft. Es zeigte sich, wie aus Bild 2 hervorgeht, praktisch keine seitliche Verschiebung der Kurven, d. h. die Beschallung hat bei den nicht hämolysierten Zellen nicht zu einer Änderung der Ionenpermeabilität geführt.

Es gibt andere mechanische Schädigungen der Erythrozyten, bei denen Kationenpermeabilität auftritt. Es ist z. B. bekannt, daß Erythrozyten bestimmter Tierarten durch Zentrifugieren kationenpermeabel werden und schnellere osmotische Hämolyse zeigen als nicht zentrifugierte Kontrollen. Das ist durch chemische Bestimmungen des ausgetretenen

Kaliums von Davson und Danielli nachgewiesen worden, und wir verfügen selbst über ähnliche Versuche, bei denen sich das gleiche mit Hilfe der osmotischen Untersuchung für Rinderblut ergab. Es bleibt zu prüfen, ob bei Blut anderer Tierarten auch die mechanische Wirkung von Ultraschall Ionenpermeabilitätsänderungen auslösen kann. Jedenfalls ist die Ultraschallhämolyse beim Hammelblut in eindeutiger Weise eine rein nicht-osmotische Hämolyse.

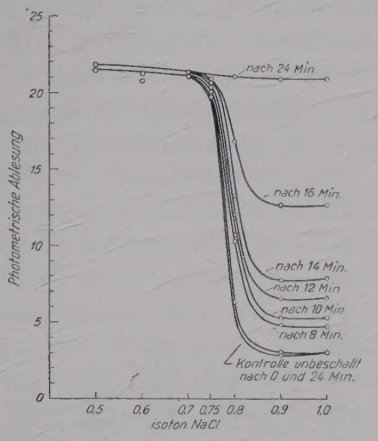

Bild 1

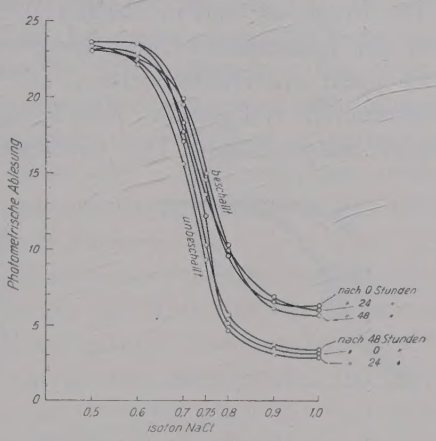

Bild 2

Bild 1. Nicht-osmotischer Charakter der Ultraschallhämolyse. Osmotische Resistenzkurven von Hammelblut nach verschiedenen Beschallungszeiten. 300 mA.

Bild 2. Prüfung auf osmotische Nachhämolyse nach der Beschallung. Osmotische Resistenzkurven von unbeschalltem und 10 Minuten beschalltem Blut (300 mA) zu verschiedenen Zeiten nach der Beschallung.

Die Wirkung der Suspensionslösung

Bei den kolloid-osmotischen Hämolysen, soweit sie daraufhin untersucht wurden, hat sich eine sehr starke Abhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit von der Zusammensetzung der Suspensionslösung nachweisen lassen. Durch Saccharose z. B. werden eine Reihe von diesen Hämolysen (Röntgen-, Ultraviolett-, Saponinhämolyse und andere) erheblich verzögert bzw. ganz verhindert. Der osmotische Charakter dieser Hämolysen macht das verständlich, da die Permeabilitätsänderung sich zunächst auf die Kationen bezieht und das große Saccharosemolekül erst bei sehr viel weitergehender Auflockerung der Membran diffusionsfähig wird. Aus dem gleichen Grund, nämlich wegen ihrer verschiedenen Diffusionsfähigkeiten, beeinflussen verschiedene Kationen die Geschwindigkeit der kolloid-osmotischen Hämolysen nach Maßgabe ihrer Ionenbeweglichkeiten, da die Kationen auch an der veränderten Membran

sehr viel langsamer diffundieren als die Anionen und daher die Schwellungsgeschwindigkeit limitieren. Für die ebenfalls sehr ausgesprochene Wirkung verschiedener Anionen wurde angenommen, daß hier die Membranpermeabilität durch die Ionen beeinflußt wird, und zwar im Sinne einer in der lyotropen Ionenreihe ansteigenden Denaturierung von Membraneiweiß, wofür verschiedene experimentelle Stützen beigebracht werden konnten (siehe frühere Mitteilungen).

Die Frage, ob und in welcher Weise eine nicht-osmotische Hämolyse von der Zusammensetzung der Suspensionslösung abhängt, ist bisher noch nicht untersucht worden. Die Ultraschallhämolyse bot dazu eine willkommene Gelegenheit. Bild 3 zeigt Ultraschallhämolysen in verschiedenen Suspensionen. Die wiedergegebenen Kurven sind hier nicht

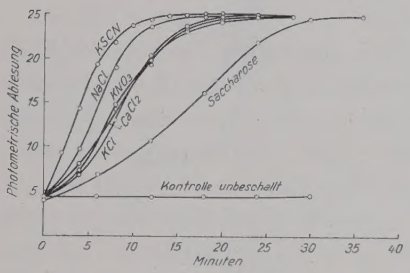

Bild 3a

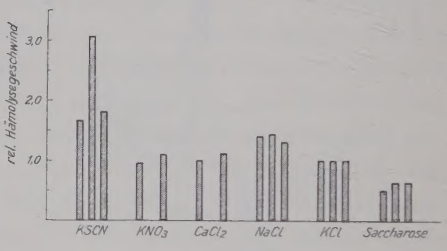

Bild 3b

Einfluß der Suspensionslösung auf die Ultraschallhämolyse.

Bild 3a. Photometrische Ablesungen in 1,0 isotonischer NaCl während der Beschallung in verschiedenen isotonischen Suspensionslösungen.

Bild 3b. Relative Hämolysegeschwindigkeit (vgl. Bild 5 und zugehörigen Text) in drei Versuchsreihen mit verschiedenen Suspensionslösungen.

Resistenzkurven, sondern es ist die photometrische Ablesung in isotonischer Kochsalzlösung gegen die Zeit aufgetragen, so daß die Kurven den zeitlichen Verlauf der Hämolyse zum Ausdruck bringen. Es zeigt sich, daß die Geschwindigkeit der Hämolyse in Saccharoselösung am kleinsten ist, während in Salzlösungen allgemein raschere Hämolyse erzielt wird. Aber auch in den verschiedenen Salzen erfolgt die Hämolyse nicht gleich rasch. Am schnellsten ist sie in Kaliumrhodanidlösung, etwas langsamer in Natriumchloridlösung und noch langsamer in Kaliumchlorid-, Calciumchlorid- und Kaliumnitratlösung. Bild 3b, in dem als Maß der Geschwindigkeit der reziproke Wert der Zeit bis zu einer bestimmten photometrischen Ablesung wiedergegeben ist, zeigt (vgl. dazu Bild 5 und zugehörigen Text), daß dieses Verhalten in mehreren Versuchsserien in gleicher Weise beobachtet wurde.

Die Deutung dieser Abhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit von der Suspensionslösung kann zweifellos nicht die gleiche sein wie bei der osmotischen Hämolyse, d. h. sie kann sich nicht auf Diffusionsgeschwindigkeit und Permeabilitätsänderung der Membran stützen. Es ist zwar in einer früheren Mitteilung diskutiert worden, ob nicht auch die sog. nicht-osmotische Hämolyse schließlich osmotisch zustande kommt, nur mit anderer zeitlicher Charakteristik, nämlich langer Induktionsphase und kurzer Schwellungsphase, und es wurde gezeigt, daß das für eine Reihe von Hämolysen wahrscheinlich ist, bei denen chemische Vorgänge an der Membran sich abspielen. Für die Salzabhängigkeit der nicht-osmotischen Ultraschallhämolyse kann diese Deutung jedoch nicht herangezogen werden, denn für die Geschwindigkeit der Hämolyse ist bei diesem Verhalten die Induktionsphase und nicht die Schwellungsphase maßgeblich, da ja die nicht-osmotische Kurvenform gerade durch das zeitliche Überwiegen der Induktion zustande kommt.

Es ist daher anzunehmen, daß die Zusammensetzung der Suspensionslösung unmittelbar von Bedeutung ist für die Resistenz der Membran gegen die mechanische Schädigung. Zur Deutung dieses zunächst überraschenden Résultates wird man daran denken müssen, daß die Auflockerung der Membranstruktur, die zur Durchlässigkeit für Kationen führen kann, wenn sie ein gewisses Maß überschreitet, vielleicht vorher schon sich in Form verminderter Resistenz gegen mechanische Beanspruchung der Membran äußern kann. Das Bild, das man sich auf Grund der Mirsky-Paulingschen Theorie der Eiweißdenaturierung vom Mechanismus der Permeabilitätsänderung machen kann (in einer späteren Mitteilung wird darauf ausführlicher eingegangen werden), läßt diese Deutung durchaus zu. In Übereinstimmung mit ihr steht auch die Tatsache, daß im wesentlichen die gleichen Lösungen die Hämolyse beschleunigen bzw. verzögern wie bei der osmotischen Hämolyse: am schnellsten ist die Hämolyse in Rhodanid-, langsamer in Chlorid- und am langsamsten in Saccharoselösung. Eine Ausnahme bildet allerdings das Verhalten des Natriumchlorids, das bei der osmotischen Hämolyse langsamere Schwellung hervorruft als Kaliumchlorid, während die Ultraschallhämolyse in Natriumchloridlösung schneller verläuft. Hier sind weitere Versuche mit einer größeren Anzahl von Salzlösungen erforderlich.

Es war noch daran zu denken, ob die Kaliumrhodanidhämolyse eine Kombination von nicht-osmotischer Ultraschallhämolyse und osmotischer Rhodanidhämolyse darstellt und ob die Beschleunigung der Hämolysegeschwindigkeit auf dieser Kombination beruht. Rhodanid ruft, wie in den früheren Mitteilungen gezeigt wurde, auch am unbehandelten Erythrozyten bereits einen gewissen Grad von Kationenpermeabilität

und damit eine gewisse osmotische Schwellung hervor. Es wurden daher, um diese Frage zu prüfen, im Verlauf einer Ultraschallhämolyse in Kaliumrhodanidlösung ganze Resistenzkurven aufgenommen, die in Bild 4 wiedergegeben sind. Es zeigt sich, daß die osmotische Hämolyse nicht schnell genug ist, um sich während der kurzen Beschallungszeit, die bis zur vollständigen Hämolyse erforderlich ist, in Form einer starken Verschiebung der hämolytischen Grenzkonzentration bemerkbar zu machen. Eine leichte Verschiebung ist deutlich zu sehen, besonders bei

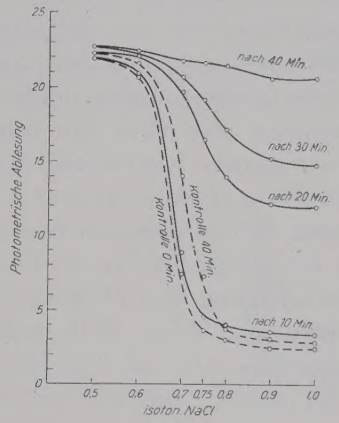

Bild 4. Prüfung auf osmotische Komponente bei der raschen Ultraschallhämolyse in isotonischer KSCN-Lösung.

Osmotische Resistenzkurven nach steigenden Beschallungszeiten. Die hämolytische Grenzkonzentration verschiebt sich während der Versuchsdauer sowohl in der beschallten als in der unbeschallten Suspension nur unbeträchtlich.

der unbeschallten Kontrolle, sie beeinflußt aber die Geschwindigkeit der Hämolysezunahme in isotonischer Lösung kaum, da erst bei sehr weitgehender Schwellung die hämolytische Grenzkonzentration an die Isotonie heranrückt und erst dann die photometrische Ablesung in isotonischer Lösung durch die osmotische Komponente nennenswert beeinflußt wird. Es ergibt sich also, daß die hohe Geschwindigkeit der Ultraschallhämolyse in Kaliumrhodanidlösung zweifellos nicht auf Kombination mit osmotischer Hämolyse beruht, sondern auf eine Beeinflussung der Membranresistenz gegen die mechanische Schädigung zurückzuführen ist.

Die Intensitätsabhängigkeit

Beschallt man unter sonst gleichen Bedingungen Proben der gleichen Blutsuspension mit verschiedenen Intensitäten, so ergibt sich eine recht steile Abhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit von der Schall-

intensität. Bild 5a zeigt Zeitkurven der Hämolyse bei Beschallung mit drei verschiedenen Stromstärken. Um ein quantitatives Maß für die Hämolysegeschwindigkeit zu bekommen, wurden die Zeiten bis zu einer bestimmten photometrischen Ablesung auf den Kurven ausgemessen (in Bild 5a mit einem Pfeil bezeichnet) und ihre reziproken Werte gegen die Stromstärke aufgetragen. Es ergibt sich eine mit zunehmender Stromstärke wachsend steiler ansteigende Kurve[1]. Es ist nun aber zu berücksichtigen, daß die Intensität dem Quadrat der Stromstärke proportional ist. Bild 5b zeigt, daß der Logarithmus der Hämolysegeschwindigkeit zu dem

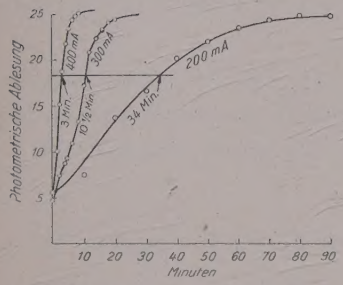

Bild 5a

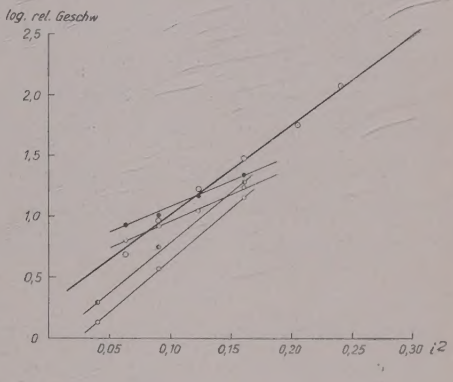

Bild 5b

Abhängigkeit der Hämolysegeschwindigkeit von der Beschallungsintensität.

Bild 5a. Zeitkurven der Hämolyse (Ablesungen in 1,0 isotonischer NaCl gegen die Zeit aufgetragen) bei verschiedenen Intensitäten. Die Pfeile zeigen die zugehörigen Hämolysezeiten für die Bestimmung der relativen Hämolysegeschwindigkeit (siehe Text).

Bild 5b. Relative Hämolysegeschwindigkeiten (logarithmisch) in Abhängigkeit vom Quadrat der Stromstärke in 5 Versuchsreihen.

Quadrat der Stromstärke und damit der Intensität in linearer Beziehung steht. Die fünf eingetragenen Kurven stammen aus fünf verschiedenen Versuchsreihen. Sie sind gegeneinander verschoben, zeigen aber den gleichen linearen Verlauf. Die verschiedene absolute Lage der Kurven dürfte auf Verschiedenheiten in der Energieübertragung durch die benützten Glasgefäße (in einer und derselben Versuchsreihe wurde jeweils das gleiche Gefäß benützt) sowie vielleicht in Unterschieden der Resistenz der verschiedenen Blutproben beruhen.

[1] In Bild 5 nicht gezeigt.

Zusammenfassung

1. Die Ultraschallhämolyse ist eine nicht-osmotische Hämolyse. Eine osmotische, auf Kationenpermeabilität beruhende Komponente läßt sich bei Hammelblut nicht nachweisen.

2. Die Geschwindigkeit der Hämolyse hängt von der Suspensionslösung ab. Sie ist in Saccharoselösung kleiner als in Salzlösungen und unter diesen am schnellsten in Kaliumrhodanid-, langsamer in Natriumchlorid- und noch langsamer in Calciumchlorid- und Kaliumnitratlösung. Die Wirkung der verschiedenen Lösungen beruht auf einer Beeinflussung der Membranresistenz gegen die mechanische Schädigung. Vermutlich liegt ihr qualitativ der gleiche Mechanismus zugrunde wie bei den kolloidosmotischen Hämolysen. Die hohe Geschwindigkeit der Ultraschallhämolyse in Kaliumrhodanidlösung beruht nicht auf einer Kombination mit gleichzeitiger osmotischer Hämolyse.

3. Die Hämolysegeschwindigkeit steigt mit zunehmender Schallintensität steil an. Der Logarithmus der Hämolysegeschwindigkeit ist dem Quadrat der Stromstärke und damit der Intensität proportional.

*

Die Durchführung der vorliegenden Versuche verdanken wir dem Entgegenkommen der Bernischen Hochschulstiftung.

Schrifttum

1. Liechti u. Wilbrandt, Strahlenther. 70 (1941): 541. — 2. Bühlmann, Liechti u. Wilbrandt, Strahlenther. 71 (1942): 285. — 3. Leu, Liechti u. Wilbrandt, Strahlenther. 71 (1942): 487. — 4. W. Wilbrandt, Pflügers Arch. 1941. — 5. Paul Langevin, Rech. et Inventions 7 (1926): 119. — 6. A. Dognon, E. u. H. Biancani, Ultra-Sons et Biologie, Paris (1937) und Radiologica 3 (1938): 40. — 7. D. Getzel, Rev. Fisic. Mat. Sci. natur. 11 (1936): 30—36. — 8. M. Reggiani, C. r. Paris 200 (1935): 123. — 9. E. Hiedemann, Grundlagen und Ergebnisse der Ultraschallforschung. Berlin 1939.